人体蠕形螨的 DNA 提取与随机引物 PCR 检测

赵亚娥*, 成 慧, 寻 萌, 吴李萍
(西安交通大学医学院免疫学与病原生物学系, 西安 710061)

摘要:【目的】探索人体毛囊蠕形螨和皮脂蠕形螨 DNA 的提取方法。【方法】采用液氮反复冻融研磨法破碎螨体细胞, 选用改良小昆虫 DNA 提取法、碱裂解法和试剂盒提取法, 分别提取冻存时间在 5 个月内和 8 ~ 10 个月的毛囊蠕形螨和皮脂蠕形螨基因组 DNA, 并用随机引物 PCR 方法进行检测。【结果】蛋白核酸测定仪检测结果显示, 试剂盒法提取的 DNA 纯度较高、量较多, 明显优于改良小昆虫法和碱裂解法。随机引物扩增结果显示清晰的 DNA 指纹图谱, 两种人体蠕形螨 DNA 指纹具有明显差异。蠕形螨冻存时间影响 DNA 提取的量, 但对 DNA 提取的纯度和 RAPD 指纹图谱影响较小。不同 DNA 提取方法提取的同一种蠕形螨 DNA 指纹图谱基本相似, 试剂盒法和改良小昆虫法提取的 DNA 样本条带多而清晰, 碱裂解法提取的样本条带少而模糊。【结论】液氮反复冻融研磨法破碎蠕形螨细胞是有效的, 蠕形螨冻存时间不宜超过 6 个月, 试剂盒提取法是提取蠕形螨 DNA 的好方法。RAPD 技术可以用于这两种人体蠕形螨 DNA 分子水平上的检测和分类。

关键词: 毛囊蠕形螨; 皮脂蠕形螨; DNA 提取; 随机引物 PCR 检测
中图分类号: Q966　**文献标识码**: A　**文章编号**: 0454-6296(2009)08-0929-05

Extraction and random primer PCR detection of genomic DNA of parasitic mites *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* (Acari: Demodicidae)

ZHAO Ya-E*, CHENG Hui, XUN Meng, WU Li-Ping (Immunology and Pathogen Biology Department, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the extraction methods of genomic DNA of parasitic mites *Demodex folliculorum* (*D. f.*) and *Demodex brevis* (*D. b.*). 【Methods】 Mites were disrupted by repeated freezing and thawing in liquid nitrogen. Then, the improved DNA extraction method of mini-insects, alkaline lysis and the commercial extraction kit were used respectively to extract genomic DNA of *D. f.* and *D. b.*, which had been kept freezing for < 5 or 8 – 10 months. 【Results】 The results of protein and nucleic acid radiometer showed the purity and quantity of genomic DNA extracted by the commercial kit were obviously better than those by other methods of mini-insects and alkaline lysis. Clear DNA fingerprints were found in the amplification results of random amplified polymorphic DNA (RAPD). There were obviously different banding patterns between *D. f.* and *D. b.* The freezing time affected the quantity of DNA extraction, but had only small effect on the purity and RAPD fingerprints of genomic DNA. The same species of mites had similar banding pattern even using different extraction methods. More and clear bands were detected by the commercial extraction kits and improved DNA extraction method of mini-insects. The bands detected by alkaline lysis method were less and obscure. 【Conclusions】 The application of repeated freezing-thawing in liquid nitrogen acts effectively to disrupt mites. The mites had better not be kept frozen more than 6 months. The commercial extraction kit is an effective approach to extract genomic DNA of mites. RAPD technique provides a simple method for detecting and classifying *D. f.* and *D. b.*

Key words: *Demodex folliculorum*; *Demodex brevis*; DNA extraction; random primer PCR detection

人体蠕形螨是寄生在人体毛囊和皮脂腺内的小型永久性寄生螨, 自 Ayres S Jr 和 Ayres SⅢ(1961)报道毛囊蠕形螨可以引起蠕形螨性毛囊糠疹和酒渣鼻以来, 越来越多的临床病例对照研究显示, 蠕形螨感染与酒糟鼻(Moravvej *et al.*, 2007; Hsu Chao-Kai *et al.*, 2009)、口周炎(Dolenc-Voljc *et al.*,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30872199); 陕西省自然科学基金资助项目(2006$C_2$47)
作者简介: 赵亚娥, 女, 1962 年 11 月出生, 西安人, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为医学螨虫
*通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zhaoyae@sina.com
收稿日期 Received: 2009-02-25; 接受日期 Accepted: 2009-06-09

2005)、脓疱性毛囊炎(Karincaoglu *et al.*, 2004)、慢性睑缘炎(Turk *et al.*, 2007)等皮肤病有关。近年研究发现，毛囊蠕形螨 *Demodex folliculorum* (*D.f.*)在酒渣鼻等颜面疾患者面部的感染度和感染率明显高于皮脂蠕形螨 *Demodex brevis* (*D. b.*)(赵亚娥等，2006)。我们推测，人体蠕形螨的种群致病性很可能也与蓝氏贾第鞭毛虫 *Giardia lamblia* 一样存在基因型差异(Read *et al.*, 2002)。而传统形态学分类方法难以解决这一问题,因此要研究人体蠕形螨种群致病性差异与基因型的差异是否有关,首先要提取基因组 DNA，采用分子生物学技术予以解决。

目前提取人体蠕形螨基因组 DNA 主要面临两个关键问题:一是虫源获取困难，人体蠕形螨虽然人群感染率很高，有报道最高可达 100%，但绝大部分感染者属轻中度感染(赵亚娥等，2006)，且不能体外培养，实验用螨只能来源于重度感染者,反复取螨给供螨者带来诸多不便，一次性获取实验所需大量虫源非常困难;二是基因组 DNA 分离提取困难，蠕形螨体型微小，体壁几丁质厚，不易匀浆，一般的基因组提取方法不能达到分子标记技术所需基因组 DNA 的质量。因而加大了人们在基因水平对蠕形螨研究的难度，从 PubMed 尚未检索到有关蠕形螨 DNA 提取的相关研究报道，分子生物学研究也几乎空白，急需寻求简便、快速、有效的提取人体蠕形螨基因组的方法。

本研究尝试用液氮冻融研磨法破碎螨体细胞，采用 3 种方法对毛囊蠕形螨和皮脂蠕形螨基因组 DNA 进行提取，用随机引物对提取的基因组 DNA 进行检测，以求获得符合分子生物学实验要求的基因组 DNA 质量，为今后在基因水平研究人体蠕形螨的分类和基因型奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 螨虫来源和样本制备

采用透明胶带粘贴法于受检者面部获取蠕形螨成虫，显微镜下鉴定虫种，用自制微型取螨针于 10 ×4 倍显微镜下按毛囊蠕形螨与皮脂蠕形螨分类挑取，毛囊蠕形螨以 1 500 头为一个样本，共收集 5 个样本；皮脂蠕形螨以 2 000 头为一个样本，共收集 4 个样本，分别装入 EP 管中，－20℃冰箱保存。

1.2 破碎细胞

将存有毛囊蠕形螨或皮脂蠕形螨的 EP 管自－20℃冰箱中取出，分别放入液氮 1 min 后立即研磨 10 min，反复 4 次，以备 DNA 提取。

1.3 提取 DNA

采用 3 种方法分别提取蠕形螨基因组 DNA，具体方法如下。

1.3.1 改良小昆虫 DNA 提取法：参照安瑞生等(2002)报道的方法并略加改进。向装有蠕形螨的 EP 管内加入 100 μL 提取液 A [1% SDS, 50 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA (pH 8.0)], 65℃水浴 45 min；加 3 mmol/L 醋酸钠 100 μL，冰上放置 1 h；12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，加等体积的饱和酚，混匀，12 000 r/min离心 10 min；取上清液，加 2 倍体积预冷的无水乙醇，混匀，放置 －20℃ 沉淀过夜；12 000 r/min离心 15 min，收集沉淀，用 70% 乙醇 400 μL 洗涤沉淀 1 次；12 000 r/min 离心 15 min，收集沉淀；37℃ 干燥 15 min，每管加入 TE 缓冲液 30 μL，充分溶解后，－20℃保存备用。

1.3.2 碱裂解法：向装有蠕形螨的 EP 管内加入 200 μL 裂解液，反复颠倒混匀，冰上放置 5 min；加入 150 μL 中和液，混匀，冰上放置 5 min；4℃下 12 000 r/min离心 15 min，取上清液，加入 800 μL 预冷的异丙醇，混匀后置－20℃沉淀过夜；4℃下 12 000 r/min 离心 15 min。沉淀管中加入预冷的 75% 酒精 500 μL，4℃下 12 000 r/min 离心 10 min，保留沉淀。放置 10 min 待酒精挥发完全。加入 TE 缓冲液 30 μL，混匀，置－20℃备用。

1.3.3 试剂盒法：采用美国 OMEGA 公司生产的 DNA 提取试剂盒。实验步骤在产品说明书的基础上略有改进。向装有蠕形螨的 EP 管内加 350 μL Buffer ML1 和 25 μL 的蛋白酶 K，混匀，60℃下孵育 30 min；向溶解物中加 350 μL 氯仿、异戊醇(24:1)，混匀，室温下 13 000 r/min 离心 2 min；取上清液，加入 5 μL RNase A，室温孵育 10～30 min；加入等体积 Buffer MBL，混匀 15 s，70℃ 孵育 10 min；加入 0.5 倍体积无水乙醇，混匀 15 s，加入 HiBind DNA 柱中，室温下 13 000 r/min 离心 1 min；向柱中加 500 μL Buffer HB，13 000 r/min 离心 30 s。用乙醇稀释的 DNA Wash Buffer 700 μL，13 000 r/min离心 1 min，重复洗涤 1 次。室温下 16 000 r/min离心 2 min 去除多余的液体。将 50 μL Elution Buffer 加在 HiBind 膜上，室温下放置 2 min，13 000 r/min 离心 1 min，洗脱 DNA，EP 管保存；重复洗脱 1 次。置－20℃备用。

1.4　基因组 DNA 检测

采用蛋白核酸测定仪对提取的蠕形螨基因组 DNA 样本进行质量检测。取 1 μL DNA 样品按说明书稀释后，直接读取 OD_{260}/OD_{280} 数值和 DNA 浓度，然后计算出每头螨虫提取 DNA 的量。

1.5　随机引物 PCR 检测

随机引物参考赵岩(2007)，依照 GenBank 中犬蠕形螨几丁质合成酶基因序列(登录号:AB080667)进行设计，由 TaKaRa 公司合成，碱基序列为:5′-TGGTGGTGAA-3′。PCR 在 BioRAD PCR 扩增仪上进行，反应体系为 25 μL(灭菌 ddH_2O 9.5 μL、模板 DNA 1 μL、2 × Master Mix 12.5 μL、引物 2 μL (10 μmol/mL)。反应参数为 94℃ 预变性 5 min，94℃变性 1 min，36℃退火 1 min，72℃延伸 2 min 条件下进行 30 个循环，最后在 72℃ 延伸 10 min，产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后，紫外透射检测仪观察并拍照。重复检测 3 次。

1.6　冻存时间对提取 DNA 的影响

用改良小昆虫法和试剂盒法分别提取冻存 5 个月以内和 8 ~ 10 个月的蠕形螨基因组 DNA。用蛋白核酸测定仪检测提取的 DNA 纯度和浓度，再用随机引物 PCR 检测 DNA 指纹图的情况。

2　结果与分析

2.1　基因组 DNA 纯度及定量检测

蛋白核酸测定仪检测结果见表 1。DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值范围在 1.6 ~ 1.8 则纯度较高。本实验结果表明，冻存时间在 5 个月以内的 5 个样本和冻存 8 ~ 10 个月的 4 个样本中，均以试剂盒法提取的 DNA 纯度较高，且 *D. f.* 样本 DNA 纯度比 *D. b.* 样本高，其比值分别为 1.72 和 1.61。

表 1　基因组 DNA 的纯度及定量分析

Table 1 Purity and quantitative analysis of genomic DNA

提取方法 Extraction method	螨株 Mite	冻存时间(月) Freezing time(month)	OD_{260}/OD_{280}	DNA 浓度 (μg/mL) DNA concentration	DNA 量(ng/头) DNA quantity (ng/mite)
改良小昆虫法 Improved DNA extraction method of mini-insects	*D. f.*	≤5	1.40	101.9	2.04
	D. b.		1.37	112.8	1.69
	D. f.	8 – 10	2.13	38.1	0.76
	D. b.		1.35	56.5	0.85
试剂盒法 Commercial extraction kit	*D. f.*	≤5	1.72	149.2	9.94
	D. b.		1.61	90.0	4.50
	D. f.	8 – 10	1.72	25.9	1.73
	D. b.		1.61	28.3	1.42
碱裂解法 Alkaline lysis	*D. f.*	≤5	1.21	106.1	2.12

D. f.：毛囊蠕形螨 *Demodex folliculorum*；*D. b.*：皮脂蠕形螨 *Demodex brevis*.

从提取的基因组 DNA 浓度来看，冻存时间在 5 个月以内的 5 个样本均在 90 ~ 150 μg/mL 之间，明显大于冻存时间为 8 ~ 10 个月的浓度。

按每头蠕形螨提取 DNA 的量可以看出，冻存时间在 5 个月以内用试剂盒法提取的 *D. f.* 样本 DNA 量为 9.94 ng/头，明显高于改良小昆虫法提取的 *D. f.* 样本 2.04 ng/头和碱裂解法提取的 *D. f.* 样本 2.12 ng/头。冻存时间在 5 个月以内用试剂盒法提取的 *D. b.* 样本 DNA 量为 4.50 ng/头，明显高于改良小昆虫法提取的 *D. b.* 样本 1.69 ng/头。

2.2　样品冻存时间对提取基因组 DNA 的影响

对比观察表 1 和图 1 可以看出，蠕形螨冻存时间的延长对提取的 DNA 纯度和 DNA 指纹图谱无明显影响，但对 DNA 的浓度影响较大。蠕形螨在 -20℃冻存时间达 8 ~ 10 个月时，改良小昆虫法和试剂盒法提取的 4 个样本 DNA 浓度和每头蠕形螨提取 DNA 的量，与冻存时间在 5 个月以内的比较均显著降低，改良小昆虫法下降幅度达 50% ~ 60%，试剂盒法下降更明显，高达 60% ~ 80%。

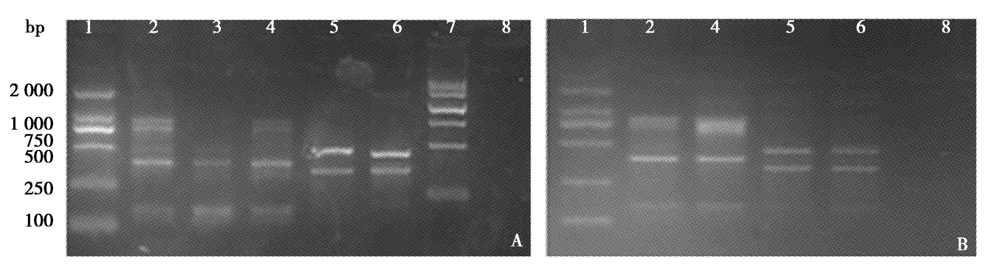


图 1 不同冻存时间样品提取的 DNA 指纹图谱比较

Fig. 1 Comparison of RAPD fingerprints of DNA extracted from sample with different freezing time

A: 冻存时间在 5 个月内 Within five months' freezing time; B: 冻存时间在 8 ~ 10 个月 Eight to ten months' freezing time. 1: DNA 分子量标准 DNA marker DL2000; 2: 改良小昆虫法提取的毛囊蠕形螨 DNA 指纹图谱 Fingerprint of *D. folliculorum* DNA extracted by improved extraction method of mini-insects; 3: 碱裂解法提取的毛囊蠕形螨 DNA 指纹图谱 Fingerprint of *D. folliculorum* DNA extracted by alkaline lysis; 4: 试剂盒法提取的毛囊蠕形螨 DNA 指纹图谱 Fingerprint of *D. folliculorum* DNA extracted by commercial extraction kit; 5: 改良小昆虫法提取的的皮脂蠕形螨 DNA 指纹图谱 Fingerprint of *D. brevis* DNA extracted by improved extraction method of mini-insects; 6: 试剂盒法提取的皮脂蠕形螨 DNA 指纹图谱 Fingerprint of *D. brevis* DNA extracted by commercial extraction kit; 7: DNA marker III; 8: 阴性对照 Negative control.

2.3 提取方法对提取基因组 DNA 的影响

随机引物扩增结果显示：用 3 种方法提取的冻存时间在 5 个月以内的 5 个样本 DNA 的数量和质量均适于 RAPD 扩增，DNA 指纹图谱清晰，具有较好的多态性位点(图 1:A)；不同提取方法提取的同一种蠕形螨 DNA 指纹图谱基本相似；实验重复性良好(图 1)。比较观察 DNA 指纹图谱发现：改良小昆虫提取法提取的样本 DNA 条带多而清晰；试剂盒法提取的样本 DNA 条带与改良小昆虫提取法提取的样本 DNA 条带基本相同，但大分子量条带较暗；碱裂解法提取的样本 DNA 条带少而模糊。

3 讨论

针对蠕形螨几丁质厚，虫体微小(100 ~ 400 μm)，破膜困难，一般方法难以提取到实验所需基因组 DNA 量的问题，本研究首先是加大螨虫数量，每个样本收集螨虫达 1 500 ~ 2 000 条，然后选择液氮冻融配合研磨的物理破膜方法对冻存时间在 5 个月以内的 5 个样本螨体细胞进行破碎，分别用改良小昆虫 DNA 提取法、碱裂解法、试剂盒法分别提取基因组 DNA。蛋白核酸测定仪检测结果表明 5 个样本均提取到基因组总 DNA(表 1)，说明采用液氮反复冻融研磨法来破碎螨体细胞，使得 DNA 释放行之有效。液氮反复冻融法使蠕形螨迅速冻结后温度降至 -196℃，后又突然回到常温融化，这种淬冷和常温反复交替的过程，使蠕形螨细胞壁两侧出现很大的温差，产生热应力，引发细胞壁断裂，促使 DNA 大量释放。

本次冻存时间在 5 个月以内的 5 个蠕形螨样本检测到的 DNA OD_{260}/OD_{280} 比值，以试剂盒法提取的 *D. f.* 样本和 *D. b.* 样本 DNA 在 1.60 ~ 1.80 之间，说明提取的样本 DNA 纯度较高，基本没有被蛋白质、酚类和 RNA 污染；而改良小昆虫 DNA 提取法和碱裂解法提取的样本 OD_{260}/OD_{280} 比值小于 1.6，说明 DNA 纯度较低，有蛋白质或酚类污染。分析试剂盒法提取 DNA 纯度较高的原因可能是：提取过程中分别加入了 ML1 Buffer 和蛋白酶 K，使蛋白质溶解，加入氯仿和异戊醇，使蛋白质沉淀；随后加入 RNase A，使 RNA 降解；并对产物用 HiBind DNA 过柱纯化，从而除去了大部分的蛋白质和 RNA 等大分子污染，得到了较高纯度的 DNA。

为了进一步对提取的基因组 DNA 进行鉴定，本文选择灵敏性高、通用性好、简便易行的随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术对 3 种方法提取的 5 个样本进行扩增。结果显示，成功地扩增出样本 DNA 指纹图谱，两种人体蠕形螨指纹图具有明显差异，可以作为 DNA 分子水平上的分类依据。

比较 3 种方法提取 DNA 样本的纯度、每头螨虫提取 DNA 的量和指纹图谱可以发现，试剂盒法明显好于改良小昆虫法，碱裂解法较差。因此，碱裂解法只对毛囊蠕形螨进行提取后，未用于皮脂蠕形螨的 DNA 提取。

比较两种蠕形螨 DNA 提取的浓度和每头螨虫提取 DNA 的量可以发现，两种蠕形螨提取 DNA 的浓度差异较小，但每头螨虫提取 DNA 的量毛囊蠕形螨明显高于皮脂蠕形螨，其原因主要是每头毛囊蠕形螨要明显大于皮脂蠕形螨，而浓度差异较小是因为我们加大了皮脂蠕形螨的数量所致。

分析试剂盒法较大分子量条带较暗原因可能有

两个：一是试剂盒法在细胞裂解时液氮冻融较短而研磨时间较长，可能破坏了 DNA 的一级结构，造成 DNA 断裂而使得大分子量 DNA 减少；二是试剂盒法提取 DNA 操作中，有除去蛋白质、RNA 以及 DNA 过柱纯化等复杂过程，使得 DNA 损耗增加，造成有些大分子量条带断裂或丢失。

蠕形螨冻存时间的延长与螨虫的自溶引起 DNA 损失增加有关，因而出现蠕形螨在 －20℃冻存 8～10 月基因组 DNA 提取的浓度和每头螨虫提取 DNA 的量明显低于冻存 5 月内基因组 DNA 提取的数量，但与提取基因组 DNA 的纯度无关。因为提取 DNA 的纯度主要与提取 DNA 的方法有关，即是否能完全除去蛋白质、RNA 和酚类等大分子和有机物的污染。因此，冻存时间的延长只能降低提取 DNA 的数量，而不会影响提取 DNA 的纯度和随机引物扩增的 RAPD 指纹图谱。研究结果提示提取蠕形螨 DNA 时，－20℃冻存时间不宜超过 6 个月。

本研究的结论是：用液氮反复冻融研磨法破碎蠕形螨等虫体微小、几丁质厚、破膜困难的螨类细胞是有效的；改良小昆虫 DNA 提取法、碱裂解法和试剂盒法均能成功提取人蠕形螨基因组 DNA，但以试剂盒提取法提取的 DNA 纯度、数量和 DNA 指纹图谱明显好于改良小昆虫 DNA 提取法和碱裂解法；蠕形螨在 －20℃冻存时间不宜超过 6 个月；随机引物既可用于检测那些没有任何分子生物学研究基础，DNA 提取量少，难以用常规方法检测到的 DNA 样本，又可用于蠕形螨的 DNA 分子水平上的分类。

参 考 文 献（References）

An RS, Tan SJ, Chen XF, 2002. Improvement in grinding tissue during extracting DNA from small insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 39: 311－312.［安瑞生，谭声江，陈晓峰，2002. 小型昆虫 DNA 提取时匀浆方法的改进. 昆虫知识，39：311－312］

Ayres S Jr, Ayres S III, 1961. Demodectic eruptions (demodicidosis) in the human: 30 years' experience with 2 commonly unrecognized entities: Pityriasis folliculorum (*Demodex*) and acne rosacea (*Demodex* type). *Arch. Dermatol.*, 83: 816－827.

Dolenc-Voljc M, Pohar M, Lunder T, 2005. Density of *Demodex folliculorum* in perioral dermatitis. *Acta Derm. Venereol.*, 85: 211－215.

Hsu CK, Hsu MML, Lee JYY, 2009. Demodicosis: a clinicopathological study. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 60: 453－462.

Karincaoglu Y, Bayram N, Aycan O, Esrefoglu M, 2004. The clinical importance of *Demodex folliculorum* presenting with nonspecific facial signs and symptoms. *J. Dermatol.*, 31: 618－626.

Moravvej H, Dehghan-Mangabadi M, Abbasian MR, Meshkat-Razavi G, 2007. Association of rosacea with demodicosis. *Arch. Iran. Med.*, 10: 199－203.

Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA, 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int. J. Parasitol.*, 32: 229－231.

Turk M, Ozturk I, Sener AG, Kucukbay S, Afsar I, Maden A, 2007. Comparison of incidence of *Demodex folliculorum* on the eyelash follicule in normal people and blepharitis patients. *Turkiye Parazitol. Derg.*, 31: 296－297.

Zhao Y, 2007. Study of Morphology and RAPD of Three Species of *Demodex*. MSc Thesis, Shandong University, Jinan.［赵岩，2007. 三种蠕形螨的形态学和 RAPD 研究. 济南：山东大学硕士学位论文］

Zhao YE, Xun M, Guo N, Huang CJ, 2006. Investigation of epidemic and pathogenicity of *Demodex* mites infestation. *Shaanxi Medical Journal*, 35: 1 416－1 418.［赵亚娥，寻萌，郭娜，黄传江，2006. 人体蠕形螨流行与致病性调查研究. 陕西医学杂志，35：1 416－1 418］

（责任编辑：邓艳）